去除 *Wolbachia* 对丽蝇蛹集金小蜂繁殖适合度和成蜂寿命的影响

李培光[1,#]，邱仕祺[1,#]，叶保华[1]，王宁新[1]，黄大卫[1,2,*]

（1. 山东农业大学植物保护学院，山东泰安 271018；2. 中国科学院动物研究所，动物进化与系统学院重点实验室，北京 100101）

摘要：【目的】明确内共生菌 *Wolbachia* 对丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 繁殖适合度和成蜂寿命的影响。【方法】通过给自然感染 *Wolbachia* 的丽蝇蛹集金小蜂成蜂喂食不同浓度的利福平来消除其体内的 *Wolbachia*，然后进行 10 个世代的连续饲养，探究不同浓度利福平对丽蝇蛹集金小蜂体内 *Wolbachia* 的去除效果和去除 *Wolbachia* 后对丽蝇蛹集金小蜂繁殖力、性比（雌蜂占子代数量的比值）和成蜂寿命的影响。【结果】低浓度利福平（0.1 ~ 0.5 mg/mL）对丽蝇蛹集金小蜂的毒害作用较小，而高浓度利福平（0.7 ~ 10.0 mg/mL）对丽蝇蛹集金小蜂的毒害作用较大，但二者均能去除丽蝇蛹集金小蜂体内的 *Wolbachia*；去除 *Wolbachia* 后丽蝇蛹集金小蜂的出蜂量显著下降（$P < 0.01$），子代中性比显著下降（$P < 0.01$），但寿命无明显差异。【结论】不同浓度利福平均能去除丽蝇蛹集金小蜂体内 *Wolbachia*，但效果不一致；*Wolbachia* 对丽蝇蛹集金小蜂的出蜂量和子代性比均有显著影响，对成蜂寿命无显著影响。

关键词：*Wolbachia*；丽蝇蛹集金小蜂；利福平；繁殖适合度；性比；寿命

中图分类号：Q965.8　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2015)09-0966-07

Influence of removing *Wolbachia* on the reproductive fitness and adult longevity of *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae)

LI Pei-Guang[1,#], QIU Shi-Qi[1,#], YE Bao-Hua[1], WANG Ning-Xin[1], HUANG Da-Wei[1,2,*] (1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; 2. Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: 【Aim】 This study aims to clarify the influence of endosymbiont *Wolbachia* on the reproductive fitness and adult longevity of *Nasonia vitripennis*. 【Methods】 Different concentrations of rifampicin (a kind of antibiotics) were used to feed *N. vitripennis* adults for removing *Wolbachia* in their bodies to assess the effect of *Wolbachia* on the reproductive fitness and adult longevity of *N. vitripennis* in the next ten consecutive generations. 【Results】 The results showed that the low rifampicin concentrations (0.1 - 0.5 mg/mL) had lower toxicity, while high rifampicin concentrations (0.7 - 10.0 mg/mL) had higher toxicity to *N. vitripennis*, but *Wolbachia* could be removed by all the concentrations of rifampicin. The number of offspring as well as sex ratio (female to all offspring ratio) of *N. vitripennis* decreased significantly after removing *Wolbachia*, while there was no significant difference in adult longevity between the *Wolbachia* infected and uninfected individuals. 【Conclusion】 All the different concentrations of rifampicin can remove *Wolbachia* from *N. vitripennis*, but the efficiency varies. *Wolbachia* has distinct effects on the number of offspring and sex ratio of *N. vitripennis*, while has no evident influence on its adult longevity.

Key words: *Wolbachia*; *Nasonia vitripennis*; rifampicin; reproductive fitness; sex ratio; longevity

---

基金项目：国家自然科学基金项目（31210103912，31101634）

作者简介：李培光，男，1987 年 11 月生，河南焦作人，硕士研究生，研究方向为昆虫生态学，E-mail：lipeiguang@qq.com；邱仕祺，男，1990 年 1 月生，山东菏泽人，硕士研究生，研究方向为昆虫生态学，E-mail：572651247@qq.com

[#]并列第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author，E-mail：huangdw@ioz.ac.cn

收稿日期 Received：2015-04-03；接受日期 Accepted：2015-06-05

沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 是一种广泛存在于节肢动物和线虫体内，随母系遗传的胞内共生菌。*Wolbachia* 在自然界中主要的传播方式为垂直传播和水平传播，其中垂直传播是从同一寄主母代到子代之间的传播，而水平传播是在不同寄主间的传播（O′Neill *et al*., 1992; Vavre *et al*., 1999; Heath *et al*., 1999; Cordaux *et al*., 2004）。*Wolbachia* 能够对宿主进行生殖调控，主要包括胞质不相容（cytoplasmic incompatibility）、诱导孤雌生殖（parthenogenesis induction）、雌性化（feminization）、杀雄作用（male killing）和物种形成等（O′Neill *et al*., 1992; Stouthamer *et al*., 1993; Hurst *et al*., 1999; 施婉君等, 2002; 董鹏和王进军, 2006）。除此之外，*Wolbachia* 还能够影响宿主的一些适合度指标，如寿命、性比、繁殖力等，但是 *Wolbachia* 对不同的寄主的影响不一样。在美洲棘蓟马 *Echinothrips americanus* 中，*Wolbachia* 能显著延长其产卵期，提高其产卵量，增加其寿命（董菁, 2012）；而在转染黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 体内 *Wolbachia* 后，埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的寿命缩短了近 50%，从而对登革热起到了防治效果（McMeniman *et al*., 2009）。去除昆虫体内 *Wolbachia* 的方法主要有低温滞育、高温处理和抗生素处理 3 种方法（van Opijnen and Breeuwer, 1999; Li *et al*., 2014），其中低温滞育和高温处理并不能彻底去除 *Wolbachia*，寄主容易在温度恢复后的连续饲养中重新感染 *Wolbachia*（Kyei-Poku *et al*., 2003）；抗生素处理也是比较常用的方法，处理效果较好，且后代不易重新获得 *Wolbachia*，但是抗生素使用剂量的多少容易对寄主产生不同的影响（Koukou *et al*., 2006; Li *et al*., 2014）。

丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripenins*（Walker）隶属于膜翅目（Hymenoptera）金小蜂科（Pteromalidae）金小蜂属 *Nasonia*，它是一种双翅目蝇类蛹期的寄生蜂，具有重要的生防价值（Whiting, 1967）。丽蝇蛹集金小蜂具有许多独特的优点：世代周期短，在 25℃ 适宜的条件下 14 d 就可以完成一个世代（Whiting, 1967; Pultz and Leaf, 2003）；雌雄特征明显易于区分（Velthuis *et al*., 1965）；不善飞行，易于实验操作；饲养条件简单，便于规模化饲养（Weston *et al*., 1999）。随着其基因组测序的完成，丽蝇蛹集金小蜂已逐步成为研究昆虫，尤其是膜翅目昆虫的模式生物。丽蝇蛹集金小蜂与内共生菌 *Wolbachia* 的相互关系国外研究较多，了解 *Wolbachia* 对中国丽蝇蛹集金小蜂种群的生殖调控作用及其繁殖适合度的影响将为我们后续深入研究奠定基础。

本研究采用不同浓度的抗生素利福平喂食丽蝇蛹集金小蜂个体，用 PCR 技术检测不同抗生素浓度下对 *Wolbachia* 的去除效果，统计各抗生素浓度下丽蝇蛹集金小蜂的存活情况，表明不同浓度的抗生素对丽蝇蛹集金小蜂的毒害作用，通过连续饲养 10 个世代去除 *Wolbachia* 丽蝇蛹集金小蜂，观察统计不同抗生素浓度处理下子代的数量、性比（雌蜂占子代数量的比值）和寿命等，探究 *Wolbachia* 对丽蝇蛹集金小蜂适合度的影响。

1　材料与方法

1.1　供试蜂种与寄主

实验所用丽蝇蛹集金小蜂 *N. vitripennis* 的虫源来自中国科学院动物研究所，为自然感染 *Wolbachia* 的纯系品种，在人工气候箱内饲养，试验所用丽蝇蛹集金小蜂 *N. vitripennis* 均为 1 日龄成蜂。饲养条件为：光期温度 28℃，暗期温度 25℃，光周期 16L∶8D，相对湿度为光期 60%，暗期为 50%；喂食 10% 的市售蜂蜜水。

麻蝇 *Sarcophaga marshalli* 为山东农业大学校园内诱集，利用 PCR 对其 *Wolbachia* 的表皮蛋白基因 *wsp* 进行检测，均未检测到 *Wolbachia* 的自然感染。其饲养条件为：光期温度 28℃，暗期温度 25℃，光周期 16L∶8D，相对湿度为 60%，喂食 10% 的市售蜂蜜水，并提供少量新鲜猪肉，供其产卵繁殖。

1.2　利福平去除 *Wolbachia*

选取大小一致刚羽化出蜂的丽蝇蛹集金小蜂 *N. vitripennis* 成蜂雌和雄各 270 头，分为 9 组，每组雌雄蜂各 10 头，每组重复 3 次。其中，1 组为对照组（CK），喂食不含利福平的蜂蜜水；其余 8 组均为实验组（D1 ~ D8），分别喂食浓度为 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 3.0, 5.0 和 10.0 mg /mL 的利福平蜂蜜水（表 1）。然后每天定点统计丽蝇蛹集金小蜂的死亡情况，主要包括雌蜂和雄蜂的死亡头数。2 d 后，每组放入大小一致、化蛹 1 – 2 d 的新鲜麻蝇蛹 5 粒，供其寄生。再 2 d 后，分别收集每组寄生的麻蝇蛹，待麻蝇蛹出蜂后对出蜂量进行统计，并对后代个体分别进行 *Wolbachia* 检测，每次雌雄各检测 5 头。

1.3　*Wolbachia* 对丽蝇蛹集金小蜂生殖调控的检测

由于丽蝇蛹集金小蜂在蝇蛹内羽化并且可以交配，所以为获得未交配的丽蝇蛹集金小蜂须在丽蝇蛹集金小蜂蛹期时剖开麻蝇蛹，区分蜂蛹的雌雄，分开收集待其羽化。

丽蝇蛹集金小蜂羽化后，挑选大小一致、未交配的感染与去除 *Wolbachia* 的雌雄丽蝇蛹集金小蜂各

12 头，进行了 4 个组合的杂交实验，分别是：感染的雌虫和感染的雄虫（♀B × ♂ B）、感染的雌虫和不感染的雄虫（♀B × ♂ D）、不感染的雌虫和不感染的雄虫（♀D × ♂ D）和不感染的雌虫和感染的雄虫（♀D × ♂ B），每个组合内 1 雌 1 雄，2 d 后各放入 1 粒大小一致新鲜的蝇蛹供其寄生，1 d 后收集寄生的麻蝇蛹。待其出蜂后，对出蜂量、性比进行统计。每个组合进行 6 个平行重复。

1.4　丽蝇蛹集金小蜂繁殖力、性比的测定

在各组实验中，取刚羽化的未交配的雄蜂和未交配的雌蜂放入一个 7 mL 的离心管中，在离心管口盖上钻孔，盖外套上尼龙网，为防止丽蝇蛹集金小蜂逃跑，盖内放入脱脂棉，在脱脂棉上注入少量 10% 的蜂蜜水，供蝇蛹金小蜂取食。2 d 后在离心管内放入 1 粒化蛹 1 - 2 d 大小一致的新鲜麻蝇蛹供其寄生。待蝇蛹出蜂后，分别统计雌蜂和雄蜂的出蜂数量。每组重复 5 次。

在实验过程中，由于丽蝇蛹集金小蜂的卵在本实验条件下无法清楚辨认，如果解剖蝇蛹，蝇蛹内的卵很难成活，所以我们用从麻蝇蛹内羽化出蜂的数量（出蜂量）代表丽蝇蛹集金小蜂的繁殖力。我们把有效去除丽蝇蛹集金小蜂体内的 *Wolbachia* 的世代记为 F_1 代，为了尽量减小抗生素利福平对丽蝇蛹集金小蜂的影响，我们从 F_3 代开始统计出蜂量，连续统计了 3 ~ 12 代，对这 10 个世代的数据进行了统计分析。另外，由于 D4（0.7 mg/mL）、D5（1.0 mg/mL）、D7（5.0 mg/mL）处理组寄生蝇蛹数量少，丽蝇蛹集金小蜂种群不足以维系该组种群繁殖，因此这 3 组实验数据不计入统计。

1.5　丽蝇蛹集金小蜂成蜂寿命的测定

我们用 D1 组作为不感染 *Wolbachia* 的代表与对照组的丽蝇蛹集金小蜂的成蜂寿命进行比较，具体方法为：每个饲养杯中放入 30 头刚羽化的丽蝇蛹集金小蜂成虫（其中 20 头雌蜂，10 头雄蜂），每天定时对杯中丽蝇蛹集金小蜂的死亡情况进行统计，并将死亡虫体清出饲养杯，饲养杯中放置 10% 蜂蜜水浸湿的脱脂棉，每天定点补充蜂蜜水。处理组和对照组均做 3 次重复，并分别统计分析处理组和对照组个体的成活率随时间的变化关系。在实验过程中，我们对处理组的丽蝇蛹集金小蜂的死亡率进行校正，校正数据为对照组的丽蝇蛹集金小蜂的死亡率。

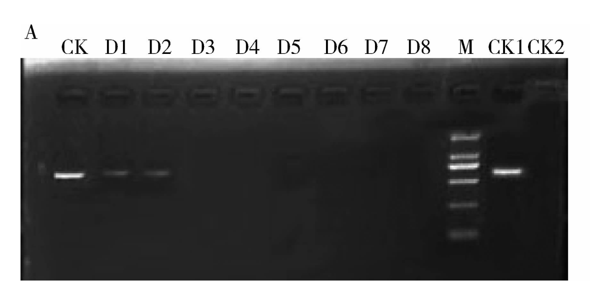
1.6　数据处理

对处理组（不同抗生素浓度）组间同一天数的致死率、组内不同天数的致死率和生殖力，成蜂寿命和后代性比数据用 One-way ANOVA 进行方差分析，用 LSD 进行差异显著性检验，用多因素方差分析比较不同世代、不同抗生素浓度和出蜂量与子代性比的相关性分析。以上数据均采用统计软件 SPSS22.0 进行分析，作图工具为 SigmaPlot。

2　结果

2.1　不同浓度利福平对丽蝇蛹集金小蜂成蜂体内的 *Wolbachia* 的去除效果

当利福平浓度大于等于 0.5 mg/mL 时，丽蝇蛹集金小蜂体内的 *Wolbachia* 可以一次性去除。当利福平浓度低于 0.5 mg/mL 时，处理组 D1（0.1 mg/mL）和 D2（0.3 mg/mL）丽蝇蛹集金小蜂体内的 *Wolbachia* 并不能一次性去除，但经 PCR 检测，相同条件下 *wsp* 条带明显变弱，对其连续 2 个世代使用抗生素处理即可有效地去除 *Wolbachia*（图 1）。



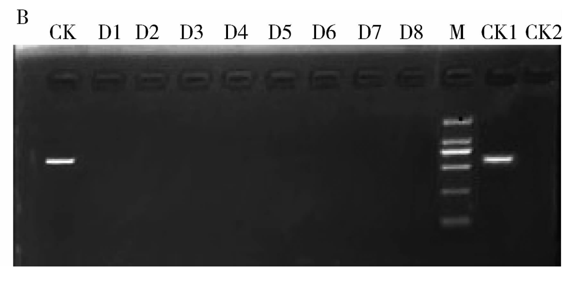


图 1　抗生素处理后 *Wolbachia*（*wsp* 基因）的检测结果

Fig. 1　PCR amplification of *wsp* of *Wolbachia*

A：不同浓度抗生素处理一次后检测结果 Results of once treatment with different concentrations of rifampicin；B：不同浓度抗生素处理两次后检测结果 Results of twice treatments with different concentrations of rifampicin. CK：10% 蜂蜜水 10% Honey；D1 - 8：分别为含 0.1，0.3，0.5，0.7，1.0，3.0，5.0 和 10.0 mg /mL 利福平的 10% 蜂蜜水 10% Honey containing 0.1，0.3，0.5，0.7，1.0，3.0，5.0 and 10.0 mg /mL rifampicin，respectively；M：DNA 分子量标准物 DNA molecular weight marker；CK1：阳性对照 Positive control；CK2：阴性对照 Negative control. 下同 The same below.

2.2 不同浓度利福平对丽蝇蛹集金小蜂成蜂死亡率的影响

不同浓度的利福平对丽蝇蛹集金小蜂成蜂的校正死亡率和平均寿命产生显著影响，随着抗生素浓度的增加，丽蝇蛹集金小蜂的校正死亡率也随之增加，寿命缩短。对照组雌蜂的平均寿命为 12.9 d，处理组雌蜂的最大平均寿命 D1 组为 10.9 d，最短平均寿命 D8 组为 2.2 d（表 1）；对照组雄蜂的平均寿命为 6.3 d，处理组雄蜂最大平均寿命 D1 组为 6.3 d，最短平均寿命为 1.8 d（表 2），雌雄蜂均表现出对照组的平均寿命高于各处理组的平均寿命；在校正死亡率方面，雌雄蜂也均表现出随着抗生素浓度的增加其 100% 的校正死亡率出现的时间也随着提前，因此抗生素对丽蝇蛹集金小蜂有一定的毒害作用，且抗生素浓度越大，对丽蝇蛹集金小蜂的毒害作用越大。

表 1　丽蝇蛹集金小蜂雌成蜂的校正死亡率和寿命

Table 1　Corrected mortality and longevity of female adults of *Nasonia vitripennis*

组别 Groups	校正死亡率 Corrected mortality (%)					寿命(d) Longevity
	1 d	5 d	9 d	13 d	17 d	
CK	–	–	–	–	–	12.9 ±0.67 a
D1	0 ±0 a	10.0 ±5.8 a	16.0 ±6.9 a	38.5 ±7.7 a	100 a	10.9 ±0.66 b
D2	3.3 ±3.3 a	16.7 ±3.3 ab	24.0 ±4.0 a	53.9 ±13.3 a	100 a	10.0 ±0.76 b
D3	10.0 ±5.8 ab	23.3 ±3.3 ab	43.9 ±4.0 b	92.4 ±7.7 b	100 a	8.2 ±0.70 c
D4	13.3 ±3.3 ab	30.0 ±5.8 b	48.0 ±4.0 b	92.4 ±7.7 b	100 a	7.4 ±0.71 cd
D5	20.0 ±5.8 b	43.3 ±3.3 c	84.0 ±4.0 c	100 b	100 a	5.7 ±0.62 d
D6	50.0 ±5.8 c	76.7 ±3.3 d	96.0 ±4.0 c	100 b	100 a	3.2 ±0.52 e
D7	60.0 ±5.8 c	96.7 ±3.3 e	100 c	100 b	100 a	2.0 ±0.30 e
D8	63.3 ±3.3 c	90.0 ±5.8 e	100 c	100 b	100 a	2.2 ±0.34 e

校正死亡率 =（处理组的死亡率 − 对照组的死亡率）/（1 − 对照组的死亡率）。表中数据为平均值 ± 标准误，同列数据后的不同字母表示在 0.05 水平上差异显著（LSD 法）。表 2 同。Corrected mortality = (the mortality of treatments − the mortality of CK)/(1 − the mortality of CK). The data in the table are mean ± *SE*, and those in the same column followed by different letters are significantly different at the 5 % level (LSD). The same for Table 2.

表 2　丽蝇蛹集金小蜂雄成蜂的校正死亡率和寿命

Table 2　Corrected mortality and longevity of male adults of *Nasonia vitripennis*

组别 Groups	校正死亡率 Corrected mortality (%)					寿命(d) Longevity
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	
CK	–	–	–	–	–	6.3 ±0.37 a
D1	0 ±0 a	10.4 ±3.5 a	20.3 ±2.2 a	63.7 ±9.1 ab	100 a	5.9 ±0.36 ab
D2	6.7 ±3.3 ab	24.2 ±3.4 b	29.4 ±8.2 ab	54.6 ±9.1 a	100 a	5.3 ±0.39 bc
D3	10.0 ±5.8 ab	27.6 ±6.0 b	44.0 ±9.1 bc	72.8 ±15.7 ab	100 a	4.8 ±0.41 c
D4	16.7 ±3.3 b	38.0 ±6.0 bc	54.5 ±4.6 cd	81.9 ±9.1 ab	100 a	4.4 ±0.40 cd
D5	26.7 ±3.3 c	44.9 ±3.4 c	68.2 ±4.5 d	100 b	100 a	3.7 ±0.38 de
D6	36.7 ±3.3 cd	62.0 ±3.5 d	90.9 ±4.5 e	100 b	100 a	2.8 ±0.31 ef
D7	43.3 ±3.3 c	75.9 ±3.4 d	100 e	100 b	100 a	2.3 ±0.25 f
D8	56.7 ±3.3 e	86.2 ±3.5 e	100 e	100 b	100 a	1.8 ±0.21 f

2.3 *Wolbachia* 对丽蝇蛹集金小蜂生殖调控的影响

针对不同 *Wolbachia* 感染状态的雌雄成蜂，我们设计 4 组杂交实验，分别是：感染的雌虫和感染的雄虫（♀ B×♂ B）、感染的雌虫和不感染的雄虫（♀ B ×♂ D）、不感染的雌虫和不感染的雄虫（♀ D×♂ D）和不感染的雌虫和感染的雄虫（♀ D×♂ B），分别统计其后代性比（雌蜂占子代数量比值）。研究结果显示前 3 组后代性比分别是 0.83，0.83 和 0.71，而♀ D×♂ B 组杂交后代性比仅为 0.11，显著低于其他 3 个组合（$P < 0.001$）（图 2）。说明 *Wolbachia* 对丽蝇蛹集金小蜂的生殖调控是强烈的胞质不相容。

2.4 *Wolbachia* 对丽蝇蛹集金小蜂出蜂量的影响

对照组（自然感染 *Wolbachia*）丽蝇蛹集金小蜂寄生麻蝇蛹的出蜂量为 25 头左右，而用不同浓度利福平处理的丽蝇蛹集金小蜂寄生麻蝇蛹的出蜂量均低于 25 头，且有随着利福平浓度增加而出蜂量下降的趋势（图 3：A）。分析表明，自然感染 *Wolbachia* 丽蝇蛹集金小蜂的出蜂量显著高于同一世代其他不同浓度利福平去除 *Wolbachia* 丽蝇蛹集金小蜂的出蜂量（$P < 0.01$），相同处理不同世代之间丽蝇蛹集金小蜂的出蜂量差异不显著（$P > 0.05$）。而处理组

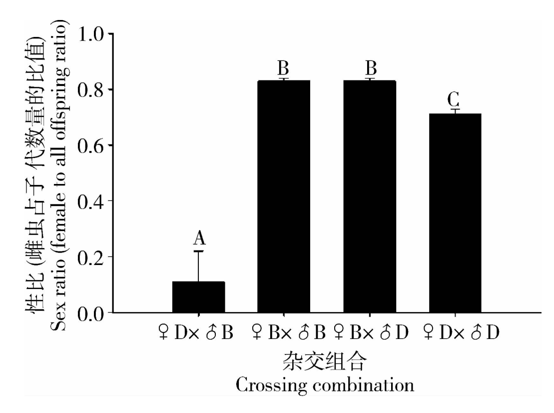


图 2 丽蝇蛹集金小蜂不感染 *Wolbachia* 种群与感染 *Wolbachia* 种群杂交结果

Fig. 2 Results of crossing experiments of different infection status of *Nasonia vitripennis*

B: 感染 *Wolbachia* 种群 *Wolbachia* infected line; D: 不感染 *Wolbachia* 种群 *Wolbachia* uninfected line.

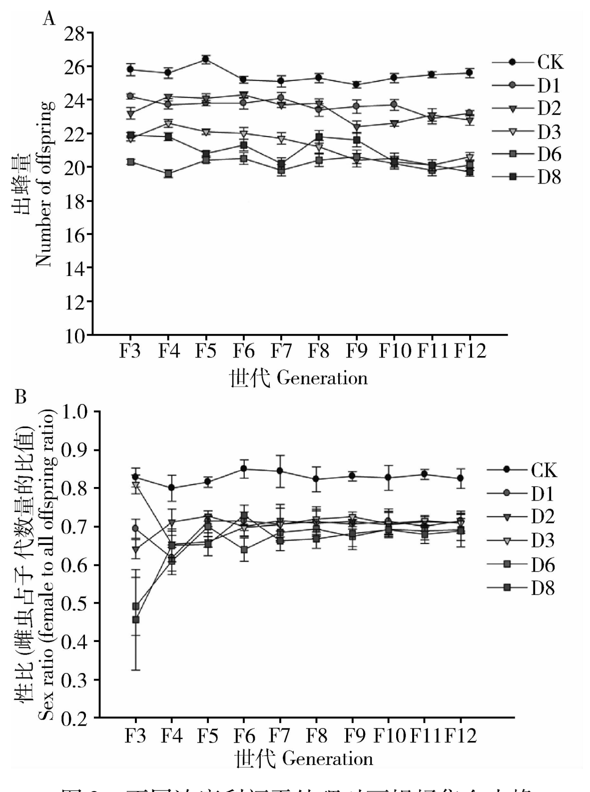


图 3 不同浓度利福平处理对丽蝇蛹集金小蜂出蜂量(A)和性比(B)的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of rifampicin on the number of offspring (A) and sex ratio (B) of *Nasonia vitripennis*

之间 D1 和 D2 的出蜂量之间无明显差异(P = 0.434),D3 和 D8 的出蜂量之间无显著差异(P = 0.228),但 D1 和 D2 与 D3 和 D8 之间均存在显著性差异($P<0.05$),D6 与 D1, D2, D3 和 D8 间均存在显著性差异($P<0.05$),各组之内不同世代之间的出蜂量均无显著差异($P>0.05$)。

2.5 *Wolbachia* 对丽蝇蛹集金小蜂性比的影响

自然感染 *Wolbachia* 丽蝇蛹集金小蜂子代的性比显著高于其他不同浓度利福平去除 *Wolbachia* 丽蝇蛹集金小蜂同世代子代的性比($P<0.01$),相同处理不同世代之间丽蝇蛹集金小蜂的性比差异不显著($P>0.05$)。自然感染 *Wolbachia* 丽蝇蛹集金小蜂的性比(雌蜂占子代数量比值)在 0.80~0.85 左右,用不同浓度利福平去除 *Wolbachia* 的丽蝇蛹集金小蜂雌虫的性比大部分在 0.65~0.72 之间(图 3: B)。不同浓度利福平去除 *Wolbachia* 的丽蝇蛹集金小蜂的性比虽然会有波动,但波动范围不大,总体趋于稳定。也就是说丽蝇蛹集金小蜂体内的 *Wolbachia* 可以显著提高子代雌虫所占的比例。

2.6 *Wolbachia* 对丽蝇蛹集金小蜂成蜂寿命的影响

利福平去除 *Wolbachia* 的丽蝇蛹集金小蜂的寿命与自然感染 *Wolbachia* 丽蝇蛹集金小蜂的寿命没有显著差异($F_{1,118}=0.004$, $P=0.947$)。自然感染 *Wolbachia* 丽蝇蛹集金小蜂雌蜂的最短寿命为 8 d,最长寿命为 21 d,平均寿命为 15.7 d;而用利福平去除 *Wolbachia* 的丽蝇蛹集金小蜂雌蜂的最短寿命为 6 d,最长寿命为 22 d,平均寿命为 15.65 d(图 4)。在前 15 d 自然感染 *Wolbachia* 的丽蝇蛹集金小蜂的存活率占优势,而 19 d 之后去除 *Wolbachia* 的丽蝇蛹集金小蜂的存活率占优势,但是这种优势不明显,没有在丽蝇蛹集金小蜂的寿命特征方面造成质的变化,即 *Wolbachia* 的存在对丽蝇蛹集金小蜂的寿命无显著影响。

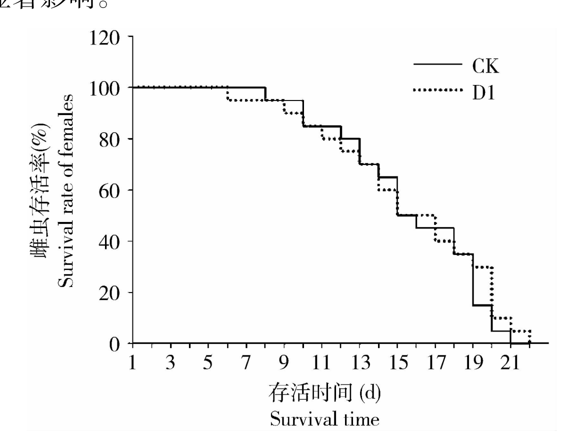


图 4 处理组(D1)和对照组(CK)丽蝇蛹集金小蜂雌成蜂寿命对比图

Fig. 4 Comparison of female adult longevity of *Nasonia vitripennis* between the treatment (D1) and the control (CK)

3 讨论

不同抗生素浓度对丽蝇蛹集金小蜂体内

Wolbachia 的处理效果和产生的毒性不一致。在实验过程中,如果想一次性去除丽蝇蛹集金小蜂体内的 *Wolbachia*,又要尽量减少抗生素对丽蝇蛹集金小蜂的毒害,使用利福平的量应控制在 0.5 ~0.7 mg/mL;如果想把利福平对丽蝇蛹集金小蜂的毒害作用降到最小,利福平的量应控制在 0.1 ~0.3 mg/mL,但是须连续喂食两代才能彻底去除 *Wolbachia*。这与抗生素在其他昆虫中的使用情况类似。使用 1 mg/mL 的四环素喂食 *Encarsia formosa*,24 h 后检测发现其仅能降低其体内的 *Wolbachia* 密度,并不能彻底去除 *Wolbachia*,但使用 5 mg/mL 的四环素处理后,*Encarsia formosa* 成蜂的寿命缩短,而 1 mg/mL 的处理与对照组相比寿命无显著差异(Stouthamer and Mak, 2002);用 50 mg/mL 的利福平喂食雌性 *Aphytis diaspidis*,1 个世代就可以彻底去除其体内的 *Wolbachia* (Zchori-Fein *et al*., 1995);用 0.1, 1, 10 和 100 mg/mL 的利福平喂食 *Muscidifurax uniraptor*,其体内的 *Wolbachia* 密度随着利福平浓度的加大而降低,100 mg/mL 利福平对 *Wolbachia* 的去除效果接近 100% (Zchori-Fein *et al*., 2000);用 1 mg/mL 的四环素喂食 *Nasonia giraulti* 雌性成虫,连续 3 个世代的饲养才可以彻底去除其体内的 *Wolbachia* (Breeuwer and Werren, 1990);用 5 mg/mL 的利福平喂食 *Trichogramma atopovirilia*,在第 1 个世代仅部分个体去除了 *Wolbachia*,3 个世代才能完全去除 *Wolbachia* (Almeida *et al*., 2010)。尽管不同昆虫对抗生素浓度高低的标准不一致,但我们的实验结果与前人研究的结果总体趋势一致,低浓度的抗生素对 *Wolbachia* 的去除效果较差,需要连续多个世代的喂食才能去除 *Wolbachia*, 高浓度的抗生素对 *Wolbachia* 的去除效果较好,但可能会产生由抗生素浓度过高造成昆虫寿命下降的现象。本实验和前人研究结果不同之处在于抗生素对 *Wolbachia* 的去除效果不一样,这可能是由于被处理的昆虫种类、抗生素品种、昆虫感染的 *Wolbachia* 株系和 *Wolbachia* 在不同昆虫体内的密度不同造成的。本实验能够为在去除丽蝇蛹集金小蜂体内的共生菌 *Wolbachia* 时所使用的利福平的量提供依据,其他抗生素的使用量还有待于探索, *Wolbachia* 的彻底消除也能够为研究 *Wolbachia* 在昆虫的生殖调控和适合度提供了方便。

本实验中,处理组 F_3 代的性比较 F_4 ~ F_{12} 差异较大,可能是由于抗生素对丽蝇蛹集金小蜂的毒害作用还未完全消除,影响了丽蝇蛹集金小蜂的一些生理活动,从而导致处理组 F_3 代的性比与 F_4 ~ F_{12} 的性比差异较大。不同的处理组之间的性比和出蜂量存在差异,这种差异可能是由于不同浓度的抗生素对丽蝇蛹集金小蜂的损伤不同,一部分损伤丽蝇蛹集金小蜂会进行自我修复,而一部分损伤则会随着世代继承下来,其中机理还有待于进一步研究。

自然的感染 *Wolbachia* 可以提高丽蝇蛹集金小蜂的出蜂量和子代的雌性比例,这与 *Wolbachia* 对一些昆虫的影响存在类似情况。在豆叶螨 *Tetranychus phaselus* 中,自然感染 *Wolbachia* 的豆叶螨的产卵量较未感染 *Wolbachia* 的豆叶螨的产卵量显著提高(赵冬晓等, 2014);在丽蚜小蜂 *Encarsia formosa* 中,感染 *Wolbachia* 个体的卵巢管数量、怀卵量均显著高于用四环素去除 *Wolbachia* 个体 F_1 ~ F_3 代的卵巢管数量、怀卵量(童蕾蕾等, 2012);在白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 中,感染 *Wolbachia* 的个体较用四环素去除 *Wolbachia* 的个体产卵量更大(Dobson *et al*., 2002);在拟澳洲赤眼蜂 *Trichogramma confusum* 中,转染短管赤眼蜂 *T. pretiosum* 体内 *Wolbachia* 的拟澳洲赤眼蜂其后代的雌性比例显著提高(潘雪红等, 2007)。然而,在一些昆虫中 *Wolbachia* 对其昆虫寄主存在负面影响或着无显著影响。在草间钻头蛛 *Hylyphantes graminicola* 中,感染 *Wolbachia* 的个体较用四环素去除 *Wolbachia* 的草间钻头蛛的性比和世代存活率均无显著差异(云月利等, 2013);在山楂双叶螨 *Amphitetranychus viennensis* 中, *Wolbachia* 对山楂双叶螨的产卵力、后代性比和死亡率没有显著影响(张艳凯等, 2014);转染 *Wolbachia* 的拟澳洲赤眼蜂的成蜂产卵量和寿命显著降低(潘雪红等, 2007);用四环素去除 *Wolbachia* 的丽蚜小蜂产生的黑蛹数量较自然感染 *Wolbachia* 丽蚜小蜂产生的黑蛹数量显著上升 (周淑香等, 2009)。不同昆虫体内 *Wolbachia* 对寄主繁殖适合度和寿命等方面的影响不尽相同,随着更多新的技术与方法的发展, *Wolbachia* 与寄主的关系将会更明确,更好地方便我们把 *Wolbachia* 利用到保护繁育天敌、防治害虫中来。

参考文献(References)

Almeida RP, Van-Lenteren JC, Stouthamer R, 2010. Does *Wolbachia* infection affect *Trichogramma atopovirilia* behaviour *Braz. J. Biol*., 70(2): 435 –442.

Breeuwer JA, Werren JH, 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature*, 346(6248): 558 –560.

Cordaux R, Michel-Salzat A, Frelon-Raimond M, Rigaud T, Bouchon D, 2004. Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the

isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications. *Heredity*, 93(1): 78–84.

Dobson SL, Marsland EJ, Rattanadechakul W, 2002. Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. *Genetics*, 160(3): 1087–1094.

Dong P, Wang JJ, 2006. Reproductive manipulation of *Wolbachia* to its hosts. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(3): 288–294. [董鹏, 王进军, 2006. 沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 对宿主的生殖调控作用及其研究进展. 昆虫知识, 43(3): 288–294]

Dong Q, 2012. Molecular Detection of *Wolbachia* and Impact on Fitness of *Echinothrips americanus* Morgan. MSc Thesis, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi. [董菁, 2012. 共生菌 *Wolbachia* 的分子检测及其对美洲棘蓟马种群适合度的影响. 陕西杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文]

Heath BD, Butcher RDJ, Whitfield WGF, Hubbard SF, 1999. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Current Biology*, 9(6): 313–316.

Hurst GDD, Bandi C, Sacchi L, Cochrane AG, Bertrand D, Karaca I, Majerus MEN, 1999. *Adonia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae) bears maternally inherited flavobacteria that kill males only. *Parasitology*, 118 (2): 125–134.

Koukou K, Pavlikaki H, Kilias G, Werren JH, Bourtzis K, Alahiotis SN, 2006. Influence of antibiotic treatment and *Wolbachia* curing on sexual isolation among *Drosophila melanogaster* cage populations. *Evolution*, 60(1): 87–96.

Kyei-Poku GK, Floate KD, Benkel B, Goettel MS, 2003. Elimination of *Wolbachia* from *Urolepis rufipes* (Hymenoptera: Pteromalidae) with heat and antibiotic treatments: implications for host reproduction. *Biocontrol Science and Technology*, 13(3): 341–354.

Li YY, Floate KD, Fields PG, Pang BP, 2014. Review of treatment methods to remove *Wolbachia* bacteria from arthropods. *Symbiosis*, 62(1): 1–15.

McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang YF, O'Neill SL, 2009. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 323 (5910): 141–144.

O'Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL, Robertson HM, 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(7): 2699–2702.

Pan XH, He YR, Chen KW, Pan F, Pan M, 2007. Effect of *Wolbachia* infection on longevity, fecundity and olfactory response of *Trichogramma confusum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Entomologica Sinica*, 50(3): 207–214. [潘雪红, 何余容, 陈科伟, 潘飞, 盘梅, 2007. *Wolbachia* 感染对拟澳洲赤眼蜂寿命、生殖力和嗅觉反应的影响. 昆虫学报, 50(3): 207–214]

Pultz MA, David SL, 2003. The jewel wasp *Nasonia*: querying the genome with haplo-diploid genetics. *Genesis*, 35(3): 185–191.

Shi WJ, Cheng JA, Zhu ZR, Jiang MX, Lou YG, 2002. Progress in the studies of insect symbiont *Wolbachia*. *Acta Ecologica Sinica*, 22(3): 409–419. [施婉君, 程家安, 祝增荣, 蒋明星, 娄永根, 2002. 昆虫共生细菌 *Wolbachia* 的研究进展. 生态学报, 22(3): 409–419]

Stouthamer R, Breeuwert JAJ, Luck RF, Werren JH, 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*, 361(6407): 66–68.

Stouthamer R, Mak K, 2002. Influence of antibiotics on the offspring production of the *Wolbachia*-infected parthenogenetic parasitoid *Encarsia formosa*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 80(1): 41–45.

Tong LL, Qi LD, Zhang F, Li YX, 2012, Effects of antibiotic treatment on reproduction of *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) infected with *Wolbachia*. *Acta Entomologica Sinica*, 55(8): 933–940. [童蕾蕾, 亓兰达, 张帆, 李元喜, 2012. 抗生素处理对感染 *Wolbachia* 的丽蚜小蜂生殖的影响. 昆虫学报, 55(8): 933–940]

Opijnen TV, Breeuwer JAJ, 1999. High temperatures eliminate *Wolbachia*, a cytoplasmic incompatibility inducing endosymbiont, from the two-spotted spider mite. *Exp. Appl. Acarol.*, 23(11): 871–881.

Vavre F, Girin C, Bouletreau M, 1999. Phylogenetic status of a fecundity-enhancing *Wolbachia* that does not induce thelytoky in *Trichogramma*. *Insect Mol. Biol.*, 8(1): 67–72.

Velthuis HHW, Velthuis-Kluppell FM, Bossink GAH, 1965. Some aspects of the biology and population dynamics of *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 8(3): 205–227.

Weston RF, Qureshi I, Werren JH, 1999. Genetics of a wing size difference between two *Nasonia* species. *J. Evol. Biol.*, 12(3): 586–595.

Whiting AR, 1967. The biology of the parasitic wasp *Mormoniella vitripennis* [= *Nasonia brevicornis*] (Walker). *Quarterly Review of Biology*, 42(3): 333–406.

Yun YL, Yang QW, Wang YF, Peng Y, Jiao XG, 2013. The removal and influence of *Wolbachia* on the reproductive and fitness in *Hylyphantes graminicola*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 40(2): 145–148. [云月利, 杨启伟, 王玉凤, 彭宇, 焦晓国, 2013. 草间钻头蛛体内沃尔巴克氏体的去除及其感染对宿主生殖和适合度的影响. 植物保护学报, 40(2): 145–148]

Zchori-Fein E, Faktor O, Zeidan M, Gottlieb Y, Czosnek H, Rosen D, 1995. Parthenogenesis-inducing microorganisms in *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Insect Mol. Biol.*, 4(3): 173–178.

Zchori-Fein E, Gottlieb Y, Coll M, 2000. *Wolbachia* density and host fitness components in *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 75(4): 267–272.

Zhang YK, Sun B, Hong XY, 2014. Infection and reproductive effects of *Wolbachia* in the hawthorn spider mite, *Amphitetranychus viennensis* (Acarina: Tetranychidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(8): 914–920. [张艳凯, 孙兵, 洪晓月, 2014. *Wolbachia* 在山楂双叶螨中的感染及对寄主生殖的影响. 昆虫学报, 57(8): 914–920]

Zhao XD, Zhang YK, Chen H, Hong XY, 2014. Effects of transinfection of *Wolbachia* from *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) on reproductive fitness and adult longevity of *Tetranychus phaselus* (Acari: Tetranychidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(1): 25–35. [赵冬晓, 张艳凯, 陈汉, 洪晓月, 2014. 转染从灰飞虱提取的 *Wolbachia* 对豆叶螨繁殖适合度和寿命的影响. 昆虫学报, 57(1): 25–35]

Zhou SX, Li Y, Zhang F, 2009. Influence of *Wolbachia* on reproduction and the fitness of the parasitoid wasp *Encarsia formosa*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 36(1): 7–10. [周淑香, 李玉, 张帆, 2009. *Wolbachia* 共生对丽蚜小蜂生殖和适应性的影响. 植物保护学报, 36(1): 7–10]

(责任编辑: 袁德成)